

酸処理SDS-PAGEによるプロテアーゼ含有タンパク質 標品の簡便な純度分析法の開発

著者	藤田 智大
発行年	2019
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9251号
URL	http://doi.org/10.15068/00158079

酸処理 SDS-PAGE によるプロテアーゼ含有 タンパク質標品の簡便な純度分析法の開発

2019 年 1 月

藤田 智大

酸処理 SDS-PAGE によるプロテアーゼ含有 タンパク質標品の簡便な純度分析法の開発

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

藤田 智大

目次

第 1 章	緒言	1
第 2 章	既往の研究	3
2-1	タンパク質医薬品に求められる純度	3
2-2	タンパク質製剤の純度分析法	5
第 3 章	中性プロテアーゼを用いた純度分析法の改良	7
3-1	ゲルろ過クロマトフィーおよび従来の SDS-PAGE 法に よる D プロテアーゼの分析	8
3-1-1	序	
3-1-2	材料および方法	
3-1-3	結果および考察	
3-2	前処理時の阻害剤の添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に 及ぼす影響	15
3-2-1	序	
3-2-2	材料および方法	
3-2-3	結果および考察	
3-3	前処理時の酸の添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に 及ぼす影響	19
3-3-1	序	
3-3-2	材料および方法	
3-3-3	結果および考察	

3-4	前処理時の酸と EDTA の添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に及ぼす影響の比較	26
3-4-1	序	
3-4-2	材料および方法	
3-4-3	結果および考察	
3-5	酸処理 SDS-PAGE 法と従来の SDS-PAGE 法の比較	31
3-5-1	序	
3-5-2	材料および方法	
3-5-3	結果および考察	
3-6	酸処理 SDS-PAGE 法によるディスパーゼ製剤の純度分析	35
3-6-1	序	
3-6-2	材料および方法	
3-6-3	結果および考察	
第 4 章	酸処理 SDS-PAGE 法の応用	39
4-1	一般的なプロテアーゼの酸処理 SDS-PAGE 法による分析	40
4-1-1	序	
4-1-2	材料および方法	
4-1-3	結果および考察	
4-2	一般的なタンパク質の酸処理 SDS-PAGE 法による分析	45
4-2-1	序	
4-2-2	材料および方法	

4-2-3 結果および考察	
4-3 プロテアーゼが混入したサンプルの酸処理 SDS-PAGE 法 による分析	
50	
4-3-1 序	
4-3-2 材料および方法	
4-3-3 結果および考察	
4-4 キャピラリー電気泳動への応用	53
4-4-1 序	
4-4-2 材料および方法	
4-4-3 結果および考察	
第5章 総括	58
引用文献	61
謝辞	64
付記	65

第 1 章 緒言

タンパク質の純度分析法として SDS-PAGE 法は一般的に用いられている。しかしながら、試料の前処理として煮沸処理が必要となる上、試料中にプロテアーゼを含んでいる場合に試料タンパク質の分解が起こり、その分解産物が分析結果に影響を及ぼすことがある。

プロテアーゼ製剤であるディスパーゼは、古くから動物の細胞や組織の培養分野で細胞分散用酵素として広く用いられてきたが、近年では再生医療分野や眼科外科領域における手術補助薬としての医療用途での利用が検討されており、非経口投与の医薬用途とするためには、プロテアーゼ製剤の純度を正確に把握し、コントロールすることが求められている。私は、ディスパーゼのメインタンパクである 32 kDa のプロテアーゼ（以下、D プロテアーゼと称す）の含有量を SDS-PAGE 法を用いて分析すると、試料中にプロテアーゼを含んでいるため、プロテアーゼ自体の分解が起こり、従来の測定法（SDS-PAGE 法など）では正確な純度の測定ができないことを独自に見出した。

この現状を踏まえ、本研究ではプロテアーゼ含有サンプルの純度を正確に分析する方法を開発することを目的とした。

はじめに（１）中性プロテアーゼの代表として D プロテアーゼを用い、従来の SDS-PAGE 法の改良研究を行い、D プロテアーゼの生化学的な特性に着目し、サンプル処理中のプロテアーゼの分解を抑制する方法を検討し、サンプル処理前のサンプルに酸を添加し、煮沸せずに電気泳動を行う酸処理 SDS-PAGE 法を開発した。開発した酸処理 SDS-PAGE 法により、D プロテアーゼの分解が完全に抑制され、D プロテアーゼの純度を正確に測定することに成功した。

次に、（２）酸処理 SDS-PAGE 法の利用性の拡大を目指し、一般的なプロテアー

ぜ、タンパク質、タンパク質とプロテアーゼが混在したサンプルの純度測定への適用と評価をおこない、酸処理 SDS-PAGE 法が広くプロテアーゼ含有サンプルに適用できることを明らかにした。さらに、SDS-PAGE と同様にタンパク質の純度分析に用いられている、キャピラリー電気泳動への適用について検討を試みた。

第 2 章 既往の研究

2-1 タンパク医薬品に求められる純度

ディスパーゼ[®] (Godo Shusei, Tokyo, Japan) は *Bacillus polymyxa* (1994 年から *Paenibacillus* 属に属名変更、Carol, 1993) の培養液中より見出されたプロテアーゼ製剤である。ディスパーゼ製剤中にメインのタンパク質として含まれている、D プロテアーゼは pH が 5~8 に至適条件を持ち、活性中心に亜鉛を配位し、安定化因子としてカルシウムイオンを必要とする中性金属プロテアーゼである。サーモライシンとアミノ酸配列で 56% の相同性を示し、立体構造や生化学的な性質 (至適 pH や要求金属など) が類似している (Ruf *et al.*, 2013)。古くから動物細胞の分散用酵素として利用されており、トリプシンやコラゲナーゼとは、異なった分解作用を示すことが認められ、他の酵素では十分な分散ができない動物細胞の集塊に対して、細胞に損傷を与えることなく単細胞に分散させることができる (Kitano and Okada, 1983、Koyama *et al.*, 1990)。現在、組織から分離した上皮細胞を培養してシート状に取り出す場合 (Okano *et al.*, 2009、Ishikawa *et al.*, 2010) や、膵臓からインスリン産生細胞を取り出す場合にディスパーゼは汎用されており、また ES 細胞 (Thomson *et al.*, 1998) や iPS 細胞 (Yan *et al.*, 2009) の継代培養などの再生医療分野においても利用されている。さらに近年では、眼科領域での医療用途として、Kaplan と Tezel (1996) の特許を応用した増殖性網膜症の外科手術における硝子体除去時の補助的用途 (Wan *et al.*, 2018) や、糖尿病性白内障の予防療法などへの利用が検討されている。

酵素は医薬品として利用されてきたが、当初はプロテアーゼやアミラーゼ、リパーゼ等が消化促進剤として、胃腸薬などに利用されるに過ぎなかった。これらは、消化酵素の補助的投与が目的であったため経口投与されることが多く、これ

までその純度が問題になることはなかった。しかし、代謝異常疾患に対する点滴による酵素補填療法や、血液凝固系に関与する酵素群の利用、上述した眼科領域における手術補助剤としての利用などの様に、酵素を体の組織に対して直接投与する必要がある場合、アレルギー惹起物質やエンドトキシンの除去など、医薬品酵素として高い純度が要求される。また同時に、予期できない副作用を未然に防ぐために、原薬としての酵素タンパク質に高い純度が求められるようになり、上述したディスパーゼに関しても医薬品用途の場合、正確に純度を測定することが求められている。しかしながら、現状では、ディスパーゼのようなプロテアーゼ製剤に関して正確に純度を分析できる方法がなく、正確に純度を分析できる方法の開発が求められている。

2-2 タンパク質製剤の純度分析法

従来、タンパク質の純度を分析する方法として、ゲルろ過法が用いられる場合もあるが、ゲルろ過法は、多孔質単体と未変性タンパクの分子量による分子篩効果でクロマトグラフをおこなうため、数万の分子量を持つタンパク質に対し数千の分子量差を見分ける分解能に欠けることが知られている。一方、SDS-PAGE（SDS-ポリアクリルアミド電気泳動）法では、まず前処理によりタンパク質を変性、SDS 化することで、タンパク質の立体構造を崩しマイナスチャージされたポリペプチド鎖とする。これを強固に重合したポリアクリルアミドゲル内で、電氣的な力により陽極側に強制的に引っ張り、ポリアクリルアミドの網目を通り抜ける速度が分子量により異なることを利用し分子量分画を行う。ゲルろ過法と比較して、タンパク質の立体構造をポリペプチド鎖として構造を揃えること、SDS によるマイナスチャージ量が分子量と比例することから、分解能が高いことが知られている (Laemli, 1995)。これらのことから、SDS-PAGE 法はタンパク質の純度を分析する方法として広く利用されている。

前節で述べたディスパーゼ製剤は、*Paenibacillus* の培養液から工業的な精製工程を経てディスパーゼ I およびディスパーゼ II というプロテアーゼ製剤が製造される。製造工程は培養液の固液分離、硫酸アンモニウム分画、UF 加水脱塩濃縮、賦形剤添加後にスプレードライによる粉末化を行いディスパーゼ II となる。ディスパーゼ I は、ディスパーゼ II の粉末を溶解し活性炭処理による脱色、UF 加水脱塩濃縮による結晶化を経て、そのタンパク結晶液を凍結乾燥させて製造している。ディスパーゼ製剤の医薬品用途での利用を目指し、最も精製が進んでいるディスパーゼ I について、メインタンパクである D プロテアーゼの純度を、従来の SDS-PAGE 法により分析したところ、プロテアーゼの自己分解と思われる多数のバンドが検出されることが明らかとなった。また、この多数のバ

ンドの発生は、高温条件下や市販のプロテアーゼ阻害剤の添加によっては全く防止できないことも判明した。従って、従来の SDS-PAGE 法ではディスパーゼ製剤中の D プロテアーゼの純度を測定することはできず、精製を進めた場合においても D プロテアーゼがどの程度の純度に達しているかはこれまで全く不明であった。

また、一般的なタンパク質製剤について述べると、高分子量のタンパク質は化学的な合成で製造することは難しく、主に微生物による培養、精製工程を経て製造される。培養液中には、培地中の窒素源を微生物が取り込むために、微生物がプロテアーゼを分泌しており、精製工程中にプロテアーゼが混入している場合が多い。プロテアーゼ以外のタンパク質製剤を製造する上でも、精製工程のサンプル中の純度を分析することは、上記ディスパーゼ I の分析と同様に、従来の SDS-PAGE 法では難しい。これらのことからプロテアーゼおよびプロテアーゼ含有サンプルの純度を正確に分析できる方法が学術、産業的に切望されている。

第 3 章 中性プロテアーゼを用いた SDS-PAGE 法の改良

SDS-PAGE 法はタンパク質の純度分析法として最もよく用いられているが、サンプルがプロテアーゼを含む場合、目的タンパク質の分解が起こり、正確な純度を求めることができない (Kubo *et al.*, 2009, 2012)。

本章では、中性プロテアーゼのモデルとしてプロテアーゼ製剤であるディスパーゼ I を用い、従来の SDS-PAGE 法によりプロテアーゼの純度を分析する際に、プロテアーゼの分解が起こるメカニズムを解明するとともに、その分解を防ぎ正確に純度を測定するための方法の開発をおこなった。

3-1 ゲルろ過クロマトフィーおよび従来の SDS-PAGE 法による D プロテアーゼの分析

3-1-1 序

ディスパーゼ製剤を医薬品用途で使用するために、ディスパーゼ I のメインタンパクである D プロテアーゼタンパクの純度測定を、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび従来の SDS-PAGE 法を用いて実施した。また、ディスパーゼ製剤を医薬品用途として用いるためには 95%以上の純度となっていることが好ましく、ディスパーゼ I からさらに精製を行い、結晶が析出するレベルとなった高度精製品を調製し、同様にゲルろ過クロマトグラフィーおよび従来の SDS-PAGE 法を用いて純度の分析、評価を試みた。

3-1-2 材料および方法

高度精製 D プロテアーゼ（精製酵素）の調製

ディスパーゼ I をタンパク質が 0.4 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。Fast protein liquid chromatography [FPLC] system (GE Healthcare, Chicago, USA) を用い、あらかじめ 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化しておいた陰イオン交換樹脂 TSK GEL DEAE 650M カラム 3 × 20 cm (Tosoh Co., Tokyo, Japan) に、上記 0.4 mg/mL に溶解したディスパーゼ I 溶液 200 mL をアプライし、吸着させた。0.1 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 8.0) によりリニアグラジエントで溶出した。本分画操作は全行程を低温実験室 (4℃) で行った。溶出画分の中性プロテアーゼ活性を測定し、D プロテアーゼと思われる溶出画分を集め、UF 膜 (Microsa AIP UF module, Asahi Kasei Co., Tokyo, Japan)

により濃縮し、50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液で脱塩を行い、電気電導度計 F70 (Horiba Co., Kyoto, Japan)で測定し、電気伝導度が 2 mS/cm 以下となるまで脱塩を行なった。これを 20,000 PU (Protease Unit) /mL 以上まで濃縮することにより結晶を析出させた。本結晶を遠心分離 (3,000 × g、10 min、4℃) により回収し、精製酵素として用いた。

中性プロテアーゼ活性の測定

中性プロテアーゼの活性測定は「日本薬局方第 14 版、一般試験法 4.03 消化力試験法、2 タンパク消化力試験法」を基におこなった。サンプルを 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) で適度に希釈し、これを 1 mL 試験管にとり、3min, 30℃に保温した。この溶液に、30℃に保温した 0.6%[w/v]ミルクカゼイン溶液 5 mL 加え、30℃で 10 min 反応させた。沈殿試薬 (トリクロル酢酸 18 g、酢酸ナトリウム 18 g、酢酸 19.8 g を精製水で 1 L とし、pH 4.0 に調整) 5 mL を加えて、反応を停止し、30℃で 30 min 静置し、沈殿を形成させた後、ろ紙 (Whatman 社製 No. 4A、GE healthcare) を用いて濾過し、濾液を分光光度計 U2000 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) に供し、 A_{275} を測定した。ブランクは、上述の沈殿試薬であらかじめ不活化したサンプルを用いた。

タンパク比活性の測定

Takara Bradford Protein Assay kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、精製酵素のタンパク量を測定した。検量線は牛血清アルブミン (Fujifilm Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) を用い、0.2、1.0 mg/mL となるように精製水で調製したものを同様に Takara Bradford Protein Assay kit に供し作成した。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

精製酵素をタンパク質が 1 mg/mL となるように 0.2 M 食塩を含む 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。このサンプルを、液体クロマトグラフ分析装置 (Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan) を用い、ゲル濾過 G2000 SWXL (Tosho Co.) カラムクロマトグラフィーに供した。

分子量が既知のサンプル (オブアルブミン : 43 kDa、キモトリプシノーゲン : 25 kDa、リボヌクレアーゼ : 14 kDa) を用いて検量線を作成した。

従来の SDS-PAGE 法

ディスパーゼ I および精製酵素をタンパク質が 1 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。ディスパーゼ I は、1 vial に 1 mg のタンパクを含むため 1 vial 当たり 1 mL の上述の緩衝液で溶解した。この溶液 100 μ L に従来のサンプル前処理液 (25%[w/v] グリセリン、2.5% [w/v] SDS、0.125 M トリス-塩酸緩衝液 pH 6.8、2.5%[w/v] 2-メルカプトエタノールおよびブロムフェノールブルー適量を含む) 100 μ L を加え、3 min 煮沸 (沸騰水中で湯浴) した。以上のように処理したサンプルを 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15%[w/v] ゲル) に供した。

3-1-3 結果および考察

ディスパーゼ I の純度の分析をおこなうにあたり、ディスパーゼ中の D プロテアーゼは活性中心に亜鉛を、安定化因子としてカルシウムを配位した至適 pH が 7.5 である中性金属プロテアーゼであるため、最も安定に活性および構造を保持できる 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。このディスパーゼ I を、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて分子量の測定をおこなった結果、30 kDa 付近のメインピークと 10 kDa 以下に多数の不純物のピークが認められた (**Fig. 1**)。またこれを従来の SDS-PAGE 法に供すると、32 kDa の D プロテアーゼのメインバンドと、メインバンドよりも低分子側に多数のバンドが検出された (**Fig. 2**)。以上の結果からディスパーゼ I はメインタンパクである 32 kDa の D プロテアーゼのほかに D プロテアーゼよりも低分子側に不純物が多数含まれていることが示された。また、その不純物は 10 kDa 以下のものはゲルろ過カラムクロマトグラフィーでのみ、10~32 kDa のものは SDS-PAGE 法でのみ、検出できることが示された。

次に、ディスパーゼ I に含まれている D プロテアーゼの更なる精製を試みた。ディスパーゼ I 溶液を DEAE カラムクロマトに供し、溶出した D プロテアーゼ画分を中性プロテアーゼ活性が 20,000 PU/mL 以上、電気電導度 2 mS/cm 以下になるように、UF 脱塩濃縮を行った。この濃縮液は脱塩濃縮中から白濁が認められ、顕微鏡 LV-150N (Nikon, CO, Tokyo, Japan) で観察すると針状結晶が浮遊しており、回収し、プロテアーゼ活性およびタンパク質含量を測定すると、タンパク質結晶であることが示された。一般的に、異種タンパク質やその他不純物が含まれているとタンパク質は結晶化しないことが知られており、本精製により、D プロテアーゼが高度に精製できていることが示唆された。

この D プロテアーゼの結晶を 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液

(pH 7.5) に溶解した精製酵素溶液をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した。この結果、30 kDa 付近のメインピークのみが検出され、10 kDa 以下の不純物ピークは検出されなかった (**Fig. 1**)。DEAE カラムクロマトによる分取および結晶化を行うことで 10 kDa 以下の不純物は除去されていることが示された。また、精製酵素溶液を従来の SDS-PAGE 法に供した結果、32 kDa の D プロテアーゼのメインバンドと、メインバンドよりも低分子側に多数のバンドが検出され、そのバンドパターンはディスパーゼ I のバンドパターンとほぼ一致した (**Fig. 2**)。

上述の様に精製した酵素は結晶化が起きていることや、ゲルろ過カラムクロマトにより 10 kDa 以下の不純物が除去されたことから、ディスパーゼ I よりも高度に精製されたことが推察されたが、従来の SDS-PAGE 法ではディスパーゼ I との純度の差が反映されなかった。また、従来の SDS-PAGE 法で検出される不純物バンドは D プロテアーゼよりも低分子側に検出されることから、SDS-PAGE をおこなう際のサンプル処理中に分解物が生じていることが推測された。この分解が生じた原因として、サンプル処理中の熱分解または D プロテアーゼがプロテアーゼであることから、サンプル処理中に自己消化が起こったことが推察された。

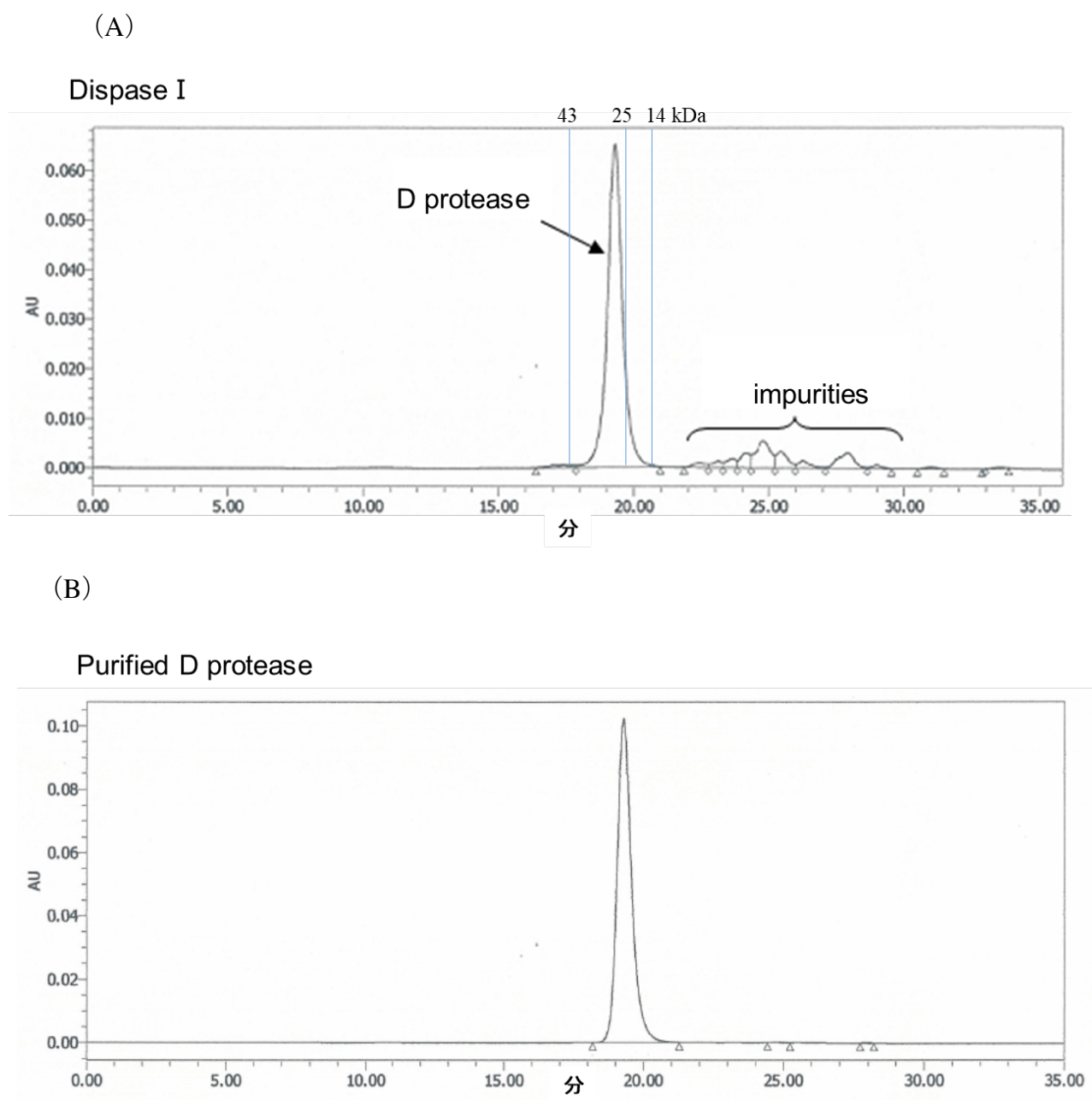


Fig 1. Purity analysis of Dispase I and purified Dispase I by SDS-PAGE using gel filtration chromatography. (A) Dispase I, (B) purified Dispase I.

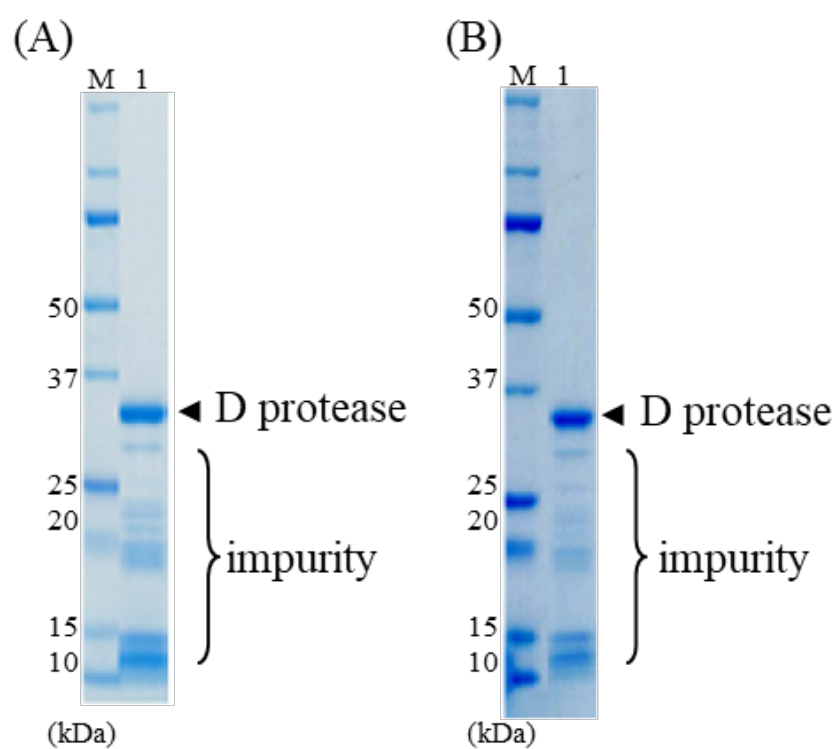


Fig. 2. Purity analysis of Dispase I and purified DispaseI by SDS-PAGE using a conventional pretreatment method. (A) M: molecular weight markers; lane 1: Dispase I, (B) M: molecular weight markers; lane 1: purified Dispase I.

3-2 前処理時の阻害剤添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に及ぼす影響

3-2-1 序

前節において、ディスパーゼ I と精製酵素が精製度に因らず、従来の SDS-PAGE 法で分析すると、同じバンドパターンを示したため、サンプル処理中に熱分解または、自己消化による分解が起こっていることが推察された。そこで、サンプル処理前のディスパーゼ I 溶解液に、各種薬剤を添加し D プロテアーゼの活性を失活させ、D プロテアーゼの活性がバンドパターンに及ぼす影響を解析した。D プロテアーゼは亜鉛を活性中心に、安定化因子としてカルシウムイオンを配位している金属プロテアーゼであるため、EDTA 等の金属キレート剤および亜鉛以外の重金属を添加し、プロテアーゼ活性を失活させることを試みた。ディスパーゼ I 溶解液に各種薬剤を添加した後にサンプル処理液を添加し、煮沸し、SDS-PAGE を行った。また煮沸中に熱分解が起こっている可能性も考えられたため、上述のサンプルを煮沸せずに SDS-PAGE に供した。

3-2-2 材料および方法

金属キレート剤、重金属、尿素の添加

市販ディスパーゼ I をタンパク質濃度が 2 mg/mL になるように、50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液 50 μ L に金属キレート剤 (5 mM EDTA、10 mM EDTA)、各種金属イオン (5 mM 塩化鉄、5 mM 硝酸ニッケル、5 mM 硫酸銅)、タンパク変性剤 (尿素 8 M) をそれぞれ 50 μ L 添加し、従来のサンプルのサンプル前処理液 100 μ L を加え 3 min 煮沸 (沸騰水中で湯浴) した。比較のために、煮沸しないものも同様に作成した。こうして処理

したサンプルを 10 μ L ずつ SDS-PAGE (15%[w/v] ゲル) に供した。

3-2-3 結果および考察

煮沸した場合、EDTA や重金属、尿素を添加した系 (**Fig. 3: lane 2~7**) では、従来の SDS-PAGE 法 (**Fig. 3: lane 1**) と同程度、又はそれ以上の不純物のバンドが検出され、いずれにおいても D プロテアーゼのバンドの濃さが従来の SDS-PAGE 法を上回ることはなかった (**Fig. 3: lane 2~7**)。一方、煮沸しなかったサンプルでは、EDTA 5、10 mM のみ D プロテアーゼのバンドが検出され (**Fig. 3: lane 9, 10**)、特に 10 mM の EDTA を添加したサンプルでは、D プロテアーゼのバンドが濃く、相対的に不純物バンドが少ない可能性が示された。サンプル処理前に EDTA を添加し、サンプル処理後に煮沸せずに SDS-PAGE に供することで、プロテアーゼの自己消化を抑制できることが推察された。

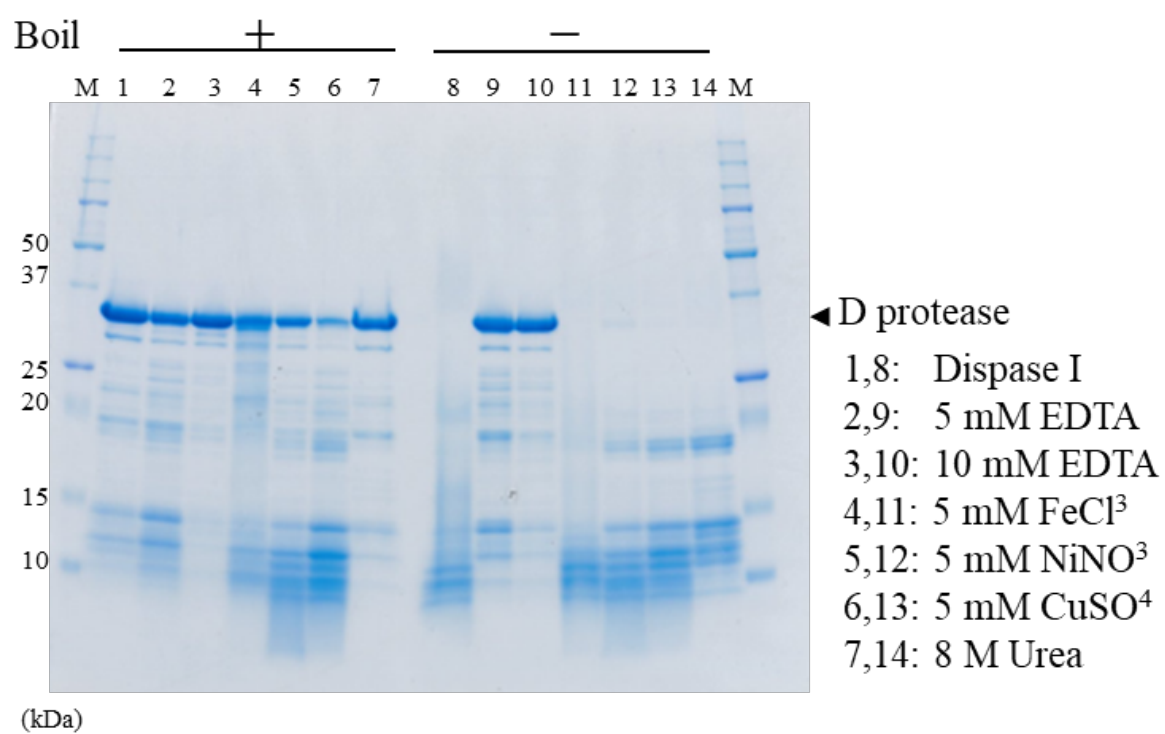


Fig. 3. Comparison of the effects of various inhibitors of D protease with or without boiling on band pattern in SDS-PAGE.

3-3 前処理時の酸の添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に及ぼす影響

3-3-1 序

前節において、ディスパーゼ I 溶解液に適切な濃度の EDTA を添加し、サンプル処理液を添加後、煮沸せずに SDS-PAGE に供することで、従来の SDS-PAGE 法と比較し不純物バンドが抑制され、D プロテアーゼのバンドが濃くなることを見出した。この原因として、EDTA によりプロテアーゼ活性が抑制され自己消化が抑制されたこと、煮沸処理をしないことで熱分解が抑制されたことが推察された。次に D プロテアーゼは中性プロテアーゼであるため、pH を酸性にすることで自己消化を抑制できるのではないかと考え、ディスパーゼ溶解液に 0.01~1.0 M の硫酸を添加後、サンプル処理液を添加し、サンプルを煮沸せずに SDS-PAGE を行った。さらに、酸の種類が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に及ぼす影響を検討するために、硫酸、塩酸、リン酸、酢酸などの酸を同様に添加することで、プロテアーゼ活性を失活させ、SDS-PAGE 分析を行うことを試みた。

3-3-2 材料および方法

硫酸の添加

ディスパーゼ I をタンパク質が 2 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液 50 μ L に 0.01 M、0.05 M、0.1 M、0.5 M、1.0 M の硫酸 (Fujifilm Wako) 50 μ L を添加し、従来の SDS-PAGE 法で用いるサンプルの前処理液 100 μ L を加えた。こうして処理したサンプルを煮沸せずに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15%[w/v] ゲル) に供した。

様々な酸の添加

デイスパーゼ I をタンパク質が 2 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液 50 μ L に 0.05 M、0.3 M リン酸、0.05 M、0.5 M 酢酸、0.05 M、0.1M 塩酸を 50 μ L を各々添加し、従来のサンプル前処理液 100 μ L を加えた。これらの酸は Fujifilm Wako Pure Chemical Co. から購入した。こうして処理したサンプルを煮沸せずに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15%[w/v]ゲル) に供した。

3-3-3 結果および考察

0.01 M の硫酸をディスパーゼ I 溶液に添加した場合、D プロテアーゼのバンドが薄く、低分子側の不純物バンドが多数認められた (**Fig. 4: lane 1**)。一方、0.05 M 以上の硫酸を添加したサンプルでは相対的に D プロテアーゼのバンドが濃く、不純物バンドが少ないことが示された。0.05 M 以上の硫酸を添加したサンプルの pH を確認すると、pH 7.5 の 50 mM トリスバッファーに溶解したディスパーゼ I 溶液の pH が 2.0 以下まで低下していることが示された。これらのことからディスパーゼ I 溶液に 0.05 M 以上の硫酸を添加することで D プロテアーゼの至適 pH の範囲から大きく外れることで自己消化を抑制できることが明らかとなった (**Fig. 4: lane 2~5**)。一方、硫酸を 1 M 添加した系では、D プロテアーゼのバンドが変形した (**Fig. 4: lane 5**)。このバンドの変形について以下に考察した。アプライしたサンプルの色を観察すると、サンプル処理後のサンプルは硫酸の濃度によらず黄色を示したが、ゲルにアプライ後は 0.01~0.5 M の硫酸を添加したサンプルは濃度が薄いものから順次青色に変化した。一方、1.0 M のサンプルでは SDS-PAGE を開始し、ゲルにバンドが引き込まれるまで黄色を示していた。サンプル処理液に含まれる pH 指示薬であるブロムフェノールブルー (BPB) は pH 3 以下で黄色、pH 3 以上で青色を示すことから、黄色のサンプルは pH 3 以下、青色のサンプルは pH 3 以上になっていることが推察された。1.0 M の硫酸を添加したサンプルでは、酸が強いことから SDS 化されたタンパク分子が電気泳動される際に、酸性状態のままで電気泳動され、バンドの形に悪影響を及ぼすと推察された。一方、0.5 M 以下の硫酸を添加した物はゲルにアプライ後はサンプルバッファー (pH 6.8) によって短時間で pH が中性に戻り、従来の SDS-PAGE 法のサンプル処理後の pH と変わらないことから、SDS-PAGE 後のバンドパターンが従来の SDS-PAGE 法と酸処理をおこなう系では変わらない事が

示された。また、0.05 M から 0.5 M までの硫酸の添加では同等の不純物バンドを示した (**Fig. 4: lane 2~5**) ことから 0.05 M の硫酸の添加で十分に D プロテアーゼの分解が抑制されていることが考えられ、酸の電気泳動に及ぼす影響を最小とするため、以後の試験では 0.05 M 硫酸をサンプル処理時に用いることとした。酸の濃度が電気泳動に影響したことから、0.05 M の硫酸で処理したサンプルを用いて、アプライ量について検討した結果、本研究で検討した 5~20 μL の間ではバンドパターンに影響は見られなかった (data not shown)。

硫酸以外の酸として塩酸、リン酸、酢酸についても同様に D プロテアーゼを分析し、バンドパターンを解析した (**Figs. 5, 6**)。この結果、不純物のバンドの生成を抑制するためには、酸の種類によらず、pH が 2.5 以下となっている事が望ましいことが示された (**Figs. 5, 6**)。また、リン酸では酸の濃度を 0.3 M と高めないと硫酸と同等の効果が得られないことが示唆された (**Fig. 5: lane 3, Fig. 6: lane 2**)。塩酸は硫酸と同濃度の 0.05 M で同等の効果が得られるが (**Fig. 5: lane 2, Fig. 6: lane 3**)、揮発性の酸であり、保存中に分解が起きやすいことから、中和滴定などで用いられる硫酸を以降の実験で用いることとした。

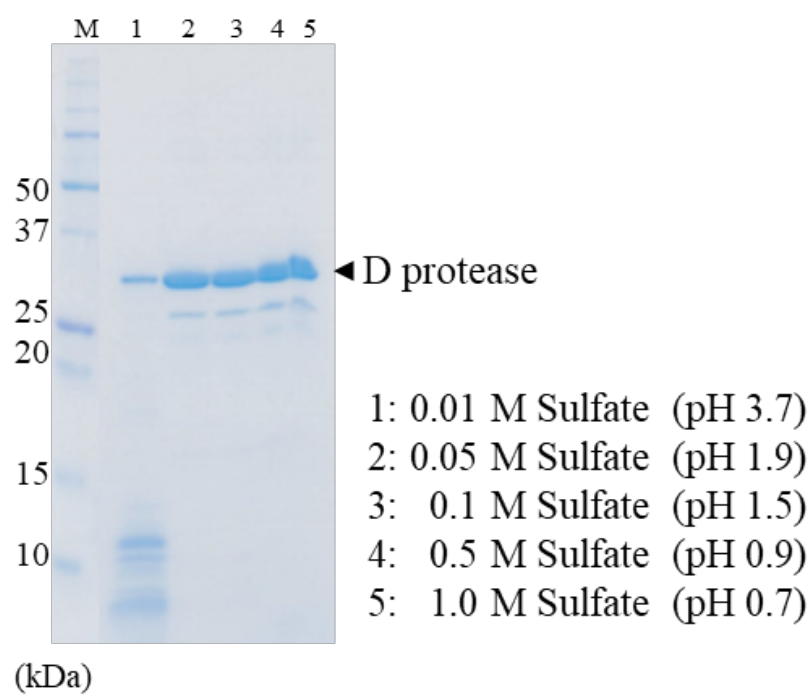


Fig. 4. Effects of adding sulfate to Disperse I solution on band pattern in SDS-PAGE.

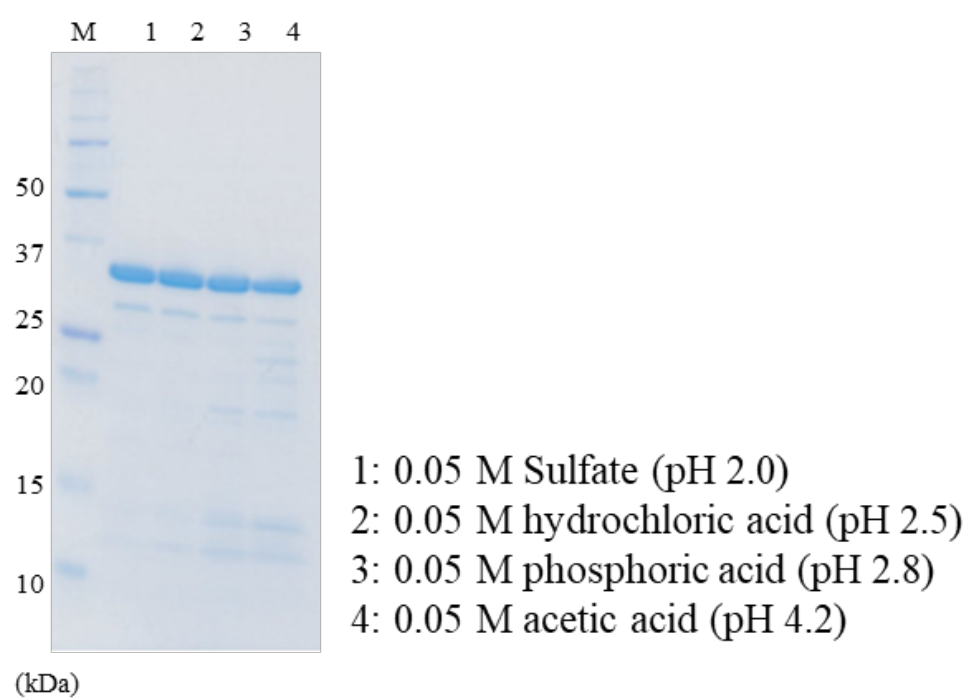


Fig. 5. Effects of adding various acid to Dispace I solution on band pattern in SDS-PAGE.

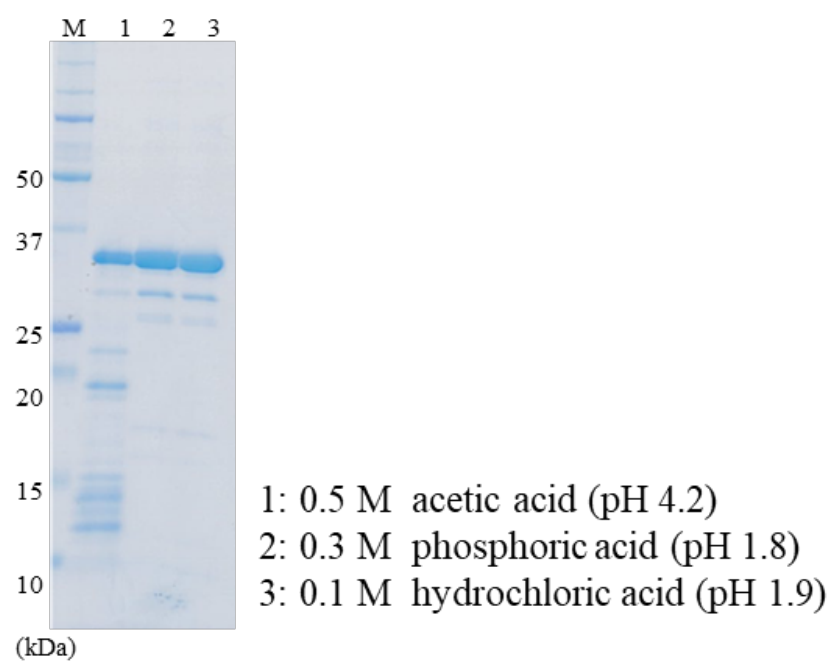


Fig. 6. Effects of adding various acid to Dispase I solution on band pattern in SDS-PAGE.

3-4 前処理時の酸と EDTA の添加が D プロテアーゼの SDS-PAGE 分析に及ぼす影響の比較

3-4-1 序

3 章 2 節および 3 節において、EDTA あるいは硫酸をデイスパーゼ I 溶液に添加し、煮沸せずに SDS-PAGE をおこなうことで不純物バンドが少なく、自己消化が抑制されることが示された。そこで本節では、硫酸添加系と EDTA 添加系のどちらがより不純物バンドを抑制するかについて比較した。EDTA について最適濃度の検討がなされていなかったため、最適濃度について検討した。EDTA は、D プロテアーゼ 1 分子に配位している 1 つの亜鉛イオンと 4 つのカルシウムイオンに対して、溶液中で金属イオン対 EDTA 分子が 1:1 のモル比でキレートする。D プロテアーゼは分子量が約 32 kDa であるため、2 mg/mL で調製した時のモル濃度は 2/32 mM となる。サンプルの前処理において、EDTA 濃度を 2~20 mM となるように添加し、D プロテアーゼと EDTA がモル比で 1:32~320 となるまで過剰量となるように添加し、詳細に検証し、硫酸添加系と比較した。

3-4-2 材料および方法

硫酸および EDTA の添加

デイスパーゼ I をタンパク質が 2 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液 50 μ L に 0.05 M 硫酸、20、10、5、2、1mM EDTA、50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) 50 μ L を各々添加し、従来のサンプル前処理液 100 μ L を加えた。処理したサンプルを煮沸せずに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15%[w/v] ゲル) に供した。

3-4-3 結果および考察

Figure 7 に示したように EDTA 濃度を 5 mM 以上とすることで D プロテアーゼのバンドが検出されるようになり、20 mM ではさらに D プロテアーゼのバンドが濃くなったが (**Fig. 7: lane 2~4**)、最も濃いバンドが検出されたものは硫酸を添加したものであった (**Fig. 7: lane 1**)。サンプル処理時のプロテアーゼ活性を測定した結果、EDTA の添加では即座に D プロテアーゼは失活せず、SDS を添加することで初めて失活していることが示された (**Table 1**)。SDS 添加時には活性が失活しているものの、EDTA 濃度が 20 mM から 5 mM へ低下すると EDTA 添加時の残存活性が高まり、それに伴い不純物バンドが増加 (**Fig. 7: lane 2~4**) していることから、残存しているプロテアーゼ活性が不純物バンドの生成に影響を及ぼすことが考えられた。また、EDTA 添加後に SDS を添加した時点で失活したことから EDTA と SDS を同時に添加するために、EDTA と SDS の混合溶液の添加も試みたところ、不純物バンドの数は、上述に示した EDTA と SDS を別々に添加した系 (**Fig. 7: lane 2~4**) と変わらなかった (data not shown)。

一方、酸処理では、酸を添加した時点から完全に D プロテアーゼが失活していることが示された (**Table 1**)。各サンプルは、活性測定のためにトリスバッファーにより 200 倍以上に希釈し、4°C で 0 および 24 h 静置後サンプルの活性を測定した (0 h 静置後 : **Table 2**、24 h 静置後 : data not shown)。この結果から、プロテアーゼ活性は、酸の添加により不可逆的に失活していることが示された。

酸処理は瞬時に不可逆的にプロテアーゼが失活しているのに対し、EDTA 処理では瞬時にプロテアーゼは失活しなかった。私は、この失活に要する時間が重要であると考えた。すなわち、失活した D プロテアーゼと失活していない D プロテアーゼが混在した場合、失活し変性した D プロテアーゼを失活していない D プロテアーゼが消化することにより不純物が生成すると推察している。

これらのことから、サンプル中の D プロテアーゼは酸の添加により瞬時に失活するために自己分解が完全に抑制され、不純物バンドの生成が高度に抑制されていることが示された。

開発した本法は酸処理 SDS-PAGE 法と命名した。以降、酸処理 SDS-PAGE 法と記載する。

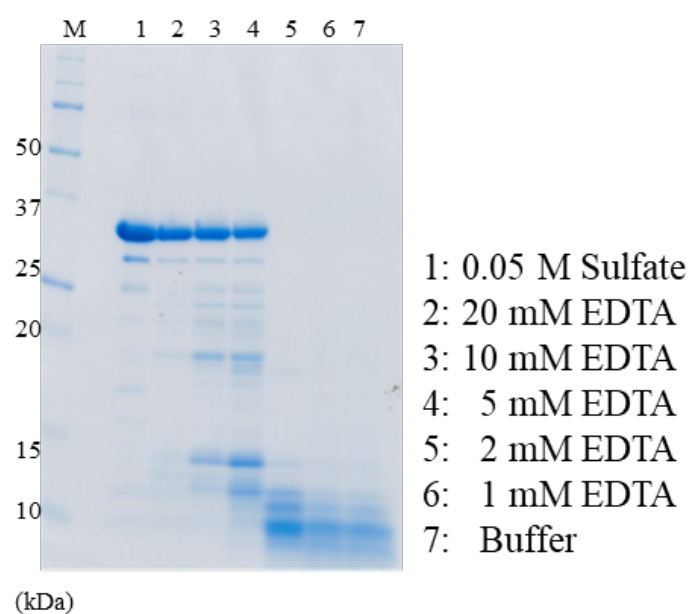


Fig. 7. Effects of sulfate or EDTA to Dispersin I solution on band pattern in SDS-PAGE.

Table 1. Protease activity during sample processing.

Inhibitors	Protease activity (U/mL)	
	Addition of inhibitors	Addition of SDS
0.05 M sulfate	0	0
20 mM EDTA	2,100	0
10 mM EDTA	4,200	0
5 mM EDTA	5,900	0
Buffer	11,000	4,600

3-5 酸処理 SDS-PAGE 法と従来の SDS-PAGE 法の比較

3-5-1 序

酸処理 SDS-PAGE 法により自己分解が高度に抑制されることが示されたため、純度の異なるディスパーゼ II（市販粗精製品）、ディスパーゼ I（市販精製品）および精製酵素を用いて D プロテアーゼの純度を分析した。各サンプルは精製度が大きく異なるため、今回は D プロテアーゼの濃度を統一するためにプロテアーゼ活性で合わせてサンプルを調製した。また各サンプルの前処理は、従来法（煮沸処理有り、無し）、酸処理 SDS-PAGE 法（煮沸処理無し）および酸処理後煮沸したもので行い SDS-PAGE に供した。

3-5-2 材料および方法

各種ディスパーゼ製剤の純度分析

酸処理 SDS-PAGE 法については、ディスパーゼ II、ディスパーゼ I、精製酵素のプロテアーゼ活性が 20,000 PU/mL となるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液（pH 7.5）に溶解した。各々の溶液 50 μ L に 0.05 M 硫酸を 50 μ L 添加し、従来のサンプル前処理液 100 μ L を加え、サンプルを煮沸せずに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE（15%[w/v] ゲル）に供した。

従来の SDS-PAGE 法については、ディスパーゼ II、ディスパーゼ I、精製酵素をプロテアーゼ活性が 10,000 PU/mL となるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液（pH 7.5）に溶解した。各々の溶液 100 μ L に従来のサンプル前処理液 100 μ L を加え、サンプルを煮沸せずに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE（15%[w/v] ゲル）に供した。

3-5-3 結果および考察

従来の SDS-PAGE で用いるサンプル前処理法では、煮沸したものも煮沸していないものも、サンプルの精製度合いに関わらず、同様のバンドパターンを示した

(**Fig. 8: lane 1~6**)。これらは本来の純度を反映していないと推察され、ディスパーゼのようなプロテアーゼの純度分析には適していないことが示された。サンプルに 0.05 M の硫酸を添加し、煮沸せずに SDS-PAGE に供した酸処理 SDS-PAGE 法では、ディスパーゼ II > ディスパーゼ I > 精製酵素の順に不純物バンドの数が減り、純度の差を明瞭に観察することができた (**Fig. 8: lane 10~12**)。サンプルに 0.05 M の硫酸を添加し煮沸してから SDS-PAGE に供したものは、いずれにおいても不純物バンドの数が酸処理 SDS-PAGE 法に比べて増加していた (**Fig. 8: lane 7~9**)。前節において、サンプルに 0.05 M の酸を添加した時点で、不可逆的にプロテアーゼ活性が失活していたことから、増加した不純物バンドは酸性下において熱分解が起こったことが推察された。

上述したように、酸処理 SDS-PAGE 法は、サンプル処理中の分解が高度に抑制され、D プロテアーゼのようなプロテアーゼの分析に適していることが示された。しかし、高度に精製した精製酵素においても D プロテアーゼのバンドの下約 30 kDa 付近に、わずかに不純物バンドが認められた (**Fig. 8 Close up: lane 12**)。この不純物バンドはディスパーゼ II の分析結果では認められない (**Fig. 8 Close up lane 10**)。以上の結果から酸処理 SDS-PAGE 法の前処理中に分解が抑制されずに僅かに産出した分解産物ではなく、元々、サンプル中に存在していた不純物であることが推察された。このことから酸処理 SDS-PAGE 法では、完全に分解が抑制され、D プロテアーゼの純度を正確に測定できることが示された。

従来の SDS-PAGE 法のサンプル処理前に、主に細胞固定やタンパクの濃縮を目的に、高濃度のトリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid : TCA) を添加する方法が

知られている (Yabuta *et al.*, 2002) ため、タンパク質の純度分析への応用について以下に考察した。本法ではサンプルに高濃度の TCA を添加し TCA 沈殿を起こしたのちに、その沈殿をアセトン洗浄後に遠心分離により回収し、バッファーに溶解して、従来の SDS-PAGE で用いるサンプル処理をおこなった後に、SDS-PAGE に供する。TCA は強力なタンパク質の沈殿剤であるが、沈殿形成量はタンパク質の種類によって異なることや、ある種のタンパク質は沈殿後に再溶解しないことが知られているため、目的とするタンパク質が適している場合には有用であるが、サンプル中に含有する全てのタンパク質の純度分析をおこなう系には適さないことが推察される。

さらに、酸処理 SDS-PAGE 法により精製酵素を分析した際に認められた約 30 kDa のバンドについて詳細に分析した。30 kDa のバンドを切り出し N 末端から 5 残基についてアミノ酸配列の分析を行なうと、D プロテアーゼの N 末端の 5 残基と完全に一致した (data not shown)。このことから 30 kDa の不純物は D プロテアーゼの C 末端が 2 kDa が切断されたタンパクであり、D プロテアーゼの自己消化産物であることが推察された。この 30 kDa の不純物は精製工程中に僅かに自己消化が起こり、D プロテアーゼと分子量が近いことから D プロテアーゼとともに結晶化し、除去できなかったことが推察された。

また、3 章 1-3 節において、この高度精製品をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分析すると 1 ピークとなったが、ゲルろ過クロマトグラフィーでは 32 kDa の D プロテアーゼと 30 kDa の不純物のように分子量が近接しており、その不純物が相対的に少ない場合に、分解能が不十分であり、このようなサンプルの純度を分析するのには全く適していないことが示された。

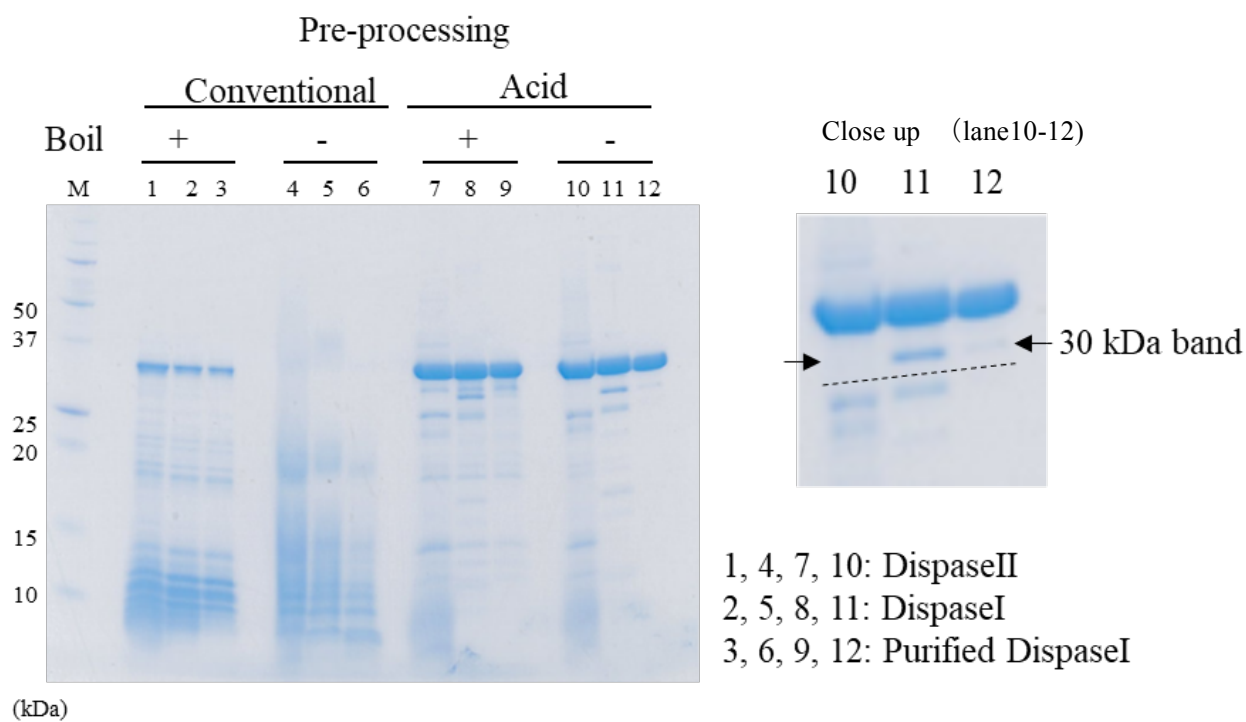


Fig. 8. Comparison of the effects of various types of preprocessing on band patterns of Dispase with different purities by SDS-PAGE.

3-6 酸処理 SDS-PAGE 法によるディスパーゼ製剤の純度分析

3-6-1 序

前節において、酸処理 SDS-PAGE 法ではサンプル処理中の分解が完全に抑制され、正確な D プロテアーゼの純度の分析が可能であることが示された。そこでディスパーゼ I および精製酵素を段階的に希釈し、酸処理 SDS-PAGE に供し、D プロテアーゼのバンドと 30 kDa のバンドの濃さを比較することで、D プロテアーゼと 30 kDa のタンパクの比率を算出し純度を測定した。

3-6-2 材料および方法

酸処理 SDS-PAGE 法によるディスパーゼ製剤の純度分析

ディスパーゼ I をタンパク質が 0.02~10 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。それぞれのサンプル 50 μ L に 0.05 M 硫酸を 50 μ L 添加し、サンプル前処理液 100 μ L を添加し、煮沸処理無しに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15%[w/v] ゲル) に供した。得られた SDS-PAGE 後のゲルを Image J (imagej.nih.gov、米国国立衛生研究所) に取り込み、デンシトメーター分析を行った。

3-6-3 結果および考察

精製酵素を段階的に希釈し、任意の濃度の精製酵素溶液を調製し、酸処理 SDS-PAGE 法で分析した結果 (**Fig. 9B**) をデンスitomーターにより評価した (**Table 2**)。精製酵素 10 mg/mL 時の 30 kDa の不純物バンドの測定値は 111 となり、精製酵素 0.2 mg/ml 時の 32 kDa の D プロテアーゼのバンドの測定値 162 を下回った (**Table 2** 太字部分参照)。このことから精製酵素 10 mg/mL 中の 30 kDa 不純物は 0.2 mg/mL 以下含まれていることが示され、精製酵素中の不純物は $0.2/10=2\%$ (w/w) 以下であり、D プロテアーゼの純度は 98% (w/w) 以上であることが示された。

同様にデイスパーゼ I を分析すると、32 kDa 以下のバンドが 10 本以上検出され、そのバンドが重なっているものも多く、各々を評価していくことは困難であった。そのため、精度の高い評価をおこなうことは困難であるが、強いて純度を算出し、以下のように推察をおこなった。バンド数が 10 本、各バンドの濃度は 2%程度と仮定すると、デイスパーゼ I 中の D プロテアーゼの純度は 80%程度となった。精製酵素のように不純物バンドの数が少ない場合は、酸処理法 SDS-PAGE とデンスitomーターによる評価で純度の分析ができるが、不純物バンドが多い場合は難しいことが示された。

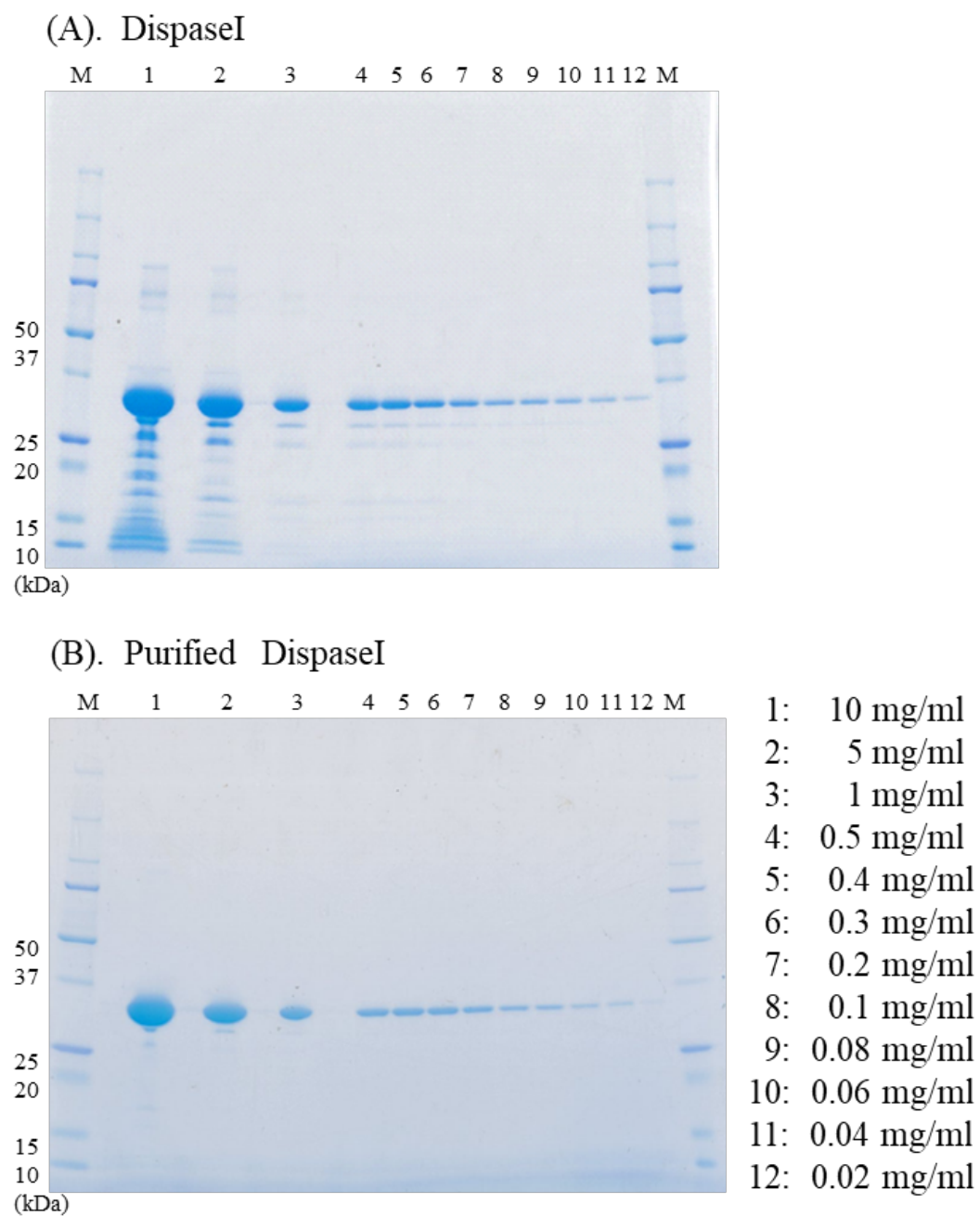


Fig. 9. Purity analysis of samples prepared by acid treatment.

Table 2. Evaluate SDS-PAGE result of Fig. 9 (B) by densitometer.

Concentration (mg/mL)	Dprotease (32 kDa area value)	Impurity (30 kDa area value)
10	858	111
5	636	80
1	337	-
0.5	221	-
0.4	217	-
0.3	198	-
0.2	162	-
0.1	95	-
0.08	78	-
0.06	50	-
0.04	55	-
0.02	-	-

第4章 酸処理 SDS-PAGE 法の応用

前章において、中性プロテアーゼである D プロテアーゼを酸処理 SDS-PAGE 法により分析すると、従来の SDS-PAGE 法で起こるサンプル処理中の自己分解が完全に抑制され、正確な純度の分析が可能であることが示された。

本章では D プロテアーゼ以外のプロテアーゼ、プロテアーゼ以外のタンパク質に酸処理 SDS-PAGE 法が応用できるか否を検証した。また、微生物の培養液、動物細胞、植物細胞の培養液およびそれらの精製工程サンプルには、細胞が窒素源を利用するためにプロテアーゼを産出することから、プロテアーゼが混入し目的タンパクの分析に影響を及ぼす場合がある。これらの事を想定しプロテアーゼとタンパクが混在しているサンプルにも酸処理 SDS-PAGE 法が応用できるか否かを検証した。

4-1 一般的なプロテアーゼの酸処理 SDS-PAGE 法による分析

4-1-1 序

酸処理 SDS-PAGE 法が一般的なプロテアーゼに応用できるかを検証した。中性プロテアーゼとして D プロテアーゼをメインタンパクとして含むディスパーゼ I およびサーモライシン、パパイン、アルカリ性プロテアーゼとしてキモトリプシン、トリプシン、サチライシン、プロテイナーゼ K、酸性プロテアーゼとしてペプシンを酸処理 SDS-PAGE 法と従来の SDS-PAGE 法で分析し、バンドパターンを比較した。

4-1-2 材料および方法

各種プロテアーゼ製剤の分析

キモトリプシン (Wako : 現 Fujifilm Wako)、トリプシン (Wako)、サチライシン (Sigma)、プロテイナーゼ K (Wako)、パパイン (Wako)、ペプシン (Wako)、サーモライシン (Wako)、ディスパーゼ I (Wako) を各々 2 mg/mL となる様に精製水に溶解した。それぞれのサンプル 50 μ L に 0.05 M 硫酸を 50 μ L 添加し、サンプル前処理液 100 μ L を添加し、煮沸処理無しに 10 μ L ずつ SDS-PAGE に供した (酸処理 SDS-PAGE 法)。また、それぞれのサンプル 100 μ L にサンプル前処理液 100 μ L を添加し、煮沸して 10 μ L ずつ SDS-PAGE (15% w/v ゲル) に供した (従来の SDS-PAGE 法)。

4-1-3 結果および考察

本研究で検討した 8 種のプロテアーゼについて、至適 pH および活性中心の種類を **Table 3** に示した。いずれにおいても従来の SDS-PAGE 法と比較して酸処理 SDS-PAGE 法では、メインバンドが同等以上の濃さとなることが示された (**Fig. 10**)。パパインに関しては、酸処理 SDS-PAGE 法において従来の SDS-PAGE 法では認められないバンドが認められた。酸処理 SDS-PAGE 法においてメインバンドが濃いことから、従来の SDS-PAGE 法ではこの不純物バンドが 10 kDa 以下にまで消化され、検出されなくなったことが推察された。これらのことから中性プロテアーゼ (パパイン、サーモライシン)、アルカリプロテアーゼ (キモトリプシン、トリプシン、プロテイナーゼ K、サチライシン) においては、酸処理 SDS-PAGE 法では、D プロテアーゼと同様にプロテアーゼ活性が瞬時に失活し、自己消化が抑制されることでメインタンパクの分解が抑制されたことが推察された。一方、ペプシンに関しては、酸性プロテアーゼであるために、酸処理 SDS-PAGE 法でバンドパターンが悪化することが予想されたが、従来の酸処理 SDS-PAGE 法と酸処理 SDS-PAGE 法の両者のバンドパターンは変わらなかった。一般的にプロテアーゼは自己消化を防ぐために、自ら分解されにくい構造を有している。しかし、従来の SDS-PAGE 法で用いるサンプルの前処理において、SDS および熱により一部のタンパクが変性することによりその防御機構が壊れ、自己消化が進むことが考えられる。酸性プロテアーゼは一般的なタンパク質の立体構造が壊れ易い酸性条件下で活性を維持する。そのため、酸性プロテアーゼは酸性および中性条件下でも自己消化をしにくい構造を有しているのではないかと推察された。これらのことから、ペプシンのような酸性プロテアーゼも同様に、酸処理 SDS-PAGE 法、従来の SDS-PAGE 法での分析が可能であると推察された。

以上の結果から、酸処理 SDS-PAGE 法は、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、酸性プロテアーゼの純度分析に応用できることが示された。

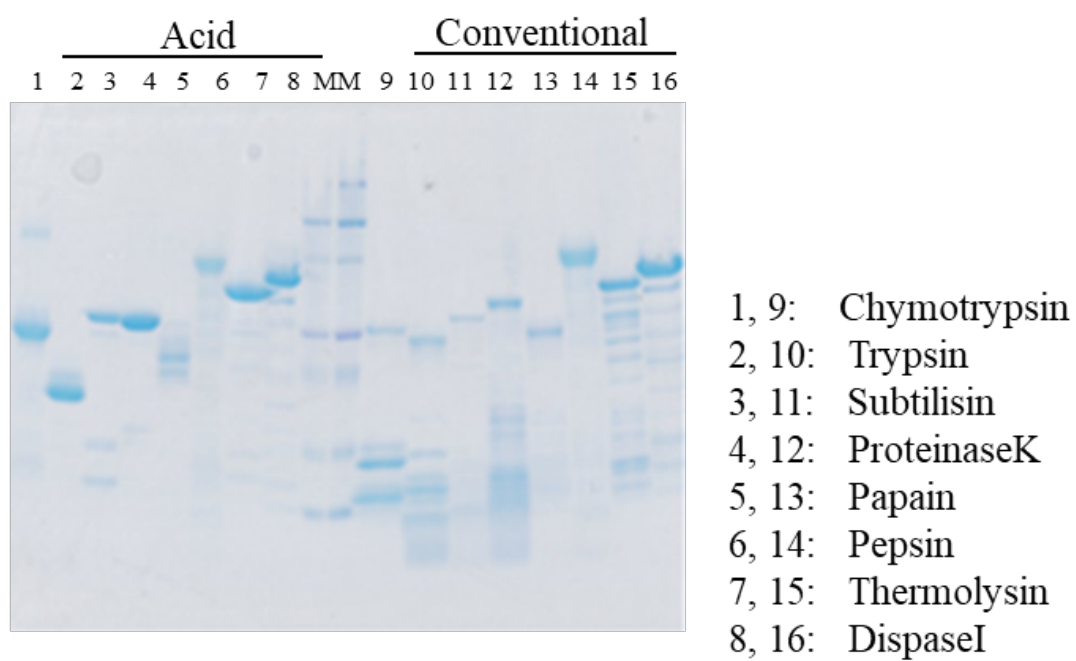


Fig. 10. Application of acid treatment SDS-PAGE method to other proteases.

Table 3. Active center of various proteases used in this study.

Lane	Sample	Active center	Optimum pH
1, 9	Chymotrypsin	Serin	8~9
2, 10	Trypsin	Serin	8~9
3, 11	Subtilisin	Serin	8~10
4, 12	ProteinaseK	Serin	8~10
5, 13	Papain	Cysteine	7~8
6, 14	Pepsin	Asparagine	2~4
7, 15	Thermolysin	Metaro	7~8
8, 16	Dispase I (Dprotease)	Metaro	7~8

4-2 一般的なタンパク質の酸処理 SDS-PAGE 法による分析

4-1-1 序

前節においてディスパーゼ以外のプロテアーゼの分析にも酸処理 SDS-PAGE 法が適用可能であることが示された。そこで本節では、酸処理 SDS-PAGE 法の幅広い利用性を検証するために、酸処理 SDS-PAGE 法と従来の SDS-PAGE 法でプロテアーゼ以外のタンパク質（牛血清アルブミン、リボヌクレアーゼ、オブアルブミン）のバンドパターンの比較測定を試みた。

4-2-2 材料および方法

牛血清アルブミン（Wako）、リボヌクレアーゼ（Sigma-Aldrich）、オブアルブミン（Wako）、サーモライシン（Wako）、ディスパーゼ I（Wako）を各々 2 mg/ml となる様に精製水に溶解した。それぞれのサンプル 50 μ L に 0.05 M 硫酸を 50 μ L 添加し、サンプル前処理液 100 μ L を添加し、煮沸処理無しに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE（15%[w/v] ゲル）に供した（酸処理 SDS-PAGE 法）。また、それぞれのサンプル 100 μ L にサンプル前処理液 100 μ L を添加し、煮沸して 10 μ L ずつ SDS-PAGE（15%[w/v] ゲル）に供した（従来の SDS-PAGE 法）。

4-2-3 結果および考察

各種のタンパク質の従来の SDS-PAGE 法および酸処理 SDS-PAGE 法における分析結果を **Fig. 11** に示した。いずれのタンパク質においても、従来の SDS-PAGE 法と酸処理 SDS-PAGE 法で分析すると、メインバンドの位置は想定される分子量 (**Table 4**) とほぼ一致していたが、詳細に比較するとアルブミン、オブアルブミンは、酸処理 SDS-PAGE 法の方がバンドの位置が僅かに低かった。サンプル処理について、従来の SDS-PAGE 法では熱により、酸処理 SDS-PAGE 法では酸により変性を行い、変性タンパクの SDS 化を行っている。バンドが低く検出されているということから、タンパク質 1 分子あたりの SDS 付着量が多く、SDS-PAGE で移動されやすくなっていることが推察された。タンパク質の SDS 化は煮沸せずに低温で 24 h かけておこなう方法もあるが、熱をかけることは分子の運動をより大きくさせてその時間を短縮させていることを意味しているが、酸変性では、その機構が異なるため、より立体構造が崩れ、アミノ酸レベルまで変性が進み、タンパク質一分子あたりの SDS 付着量が増えるのではないかと推察される。

また、そのバンドパターンを、従来の SDS-PAGE 法と酸処理 SDS-PAGE 法で比較すると、アルブミンについては、ほぼ同一のバンドパターンを示したがそれ以外は異なるバンドパターンを示した。キモトリプシノーゲン、リボヌクレアーゼについては、従来の SDS-PAGE 法ではメインバンドよりも低分子側に無数のバンドが検出されることから、プロテアーゼがわずかに混入しており、分解が起こっていることが推察された。また、リボヌクレアーゼでは従来の SDS-PAGE 法で 20~25 kDa 付近のバンドが認められたが酸処理 SDS-PAGE 法では認められなかった。オブアルブミンでは、メインタンパクよりも高分子側のバンドが従来法 SDS-PAGE ではスミアであり、酸処理 SDS-PAGE 法では多数の

バンドが検出された。

これらのバンドパターンが異なる機構については現時点では未解明である。今後、各バンドを切り出し、N末分析を行うなど、そのバンドの由来を検証してゆくことで各バンドの発生要因が明らかになると考えられる。

以上の結果から、今回、検討したサンプルについては、メインのタンパク質以外でバンドパターンに僅かに差が認められたものの、少なくともアルブミンやリボヌクレアーゼ、キモトリプシノーゲンのように、酸処理 SDS-PAGE 法の方が従来法 SDS-PAGE よりも分解が抑えられているようなサンプルに関しては純度の分析に適用できると推察された。

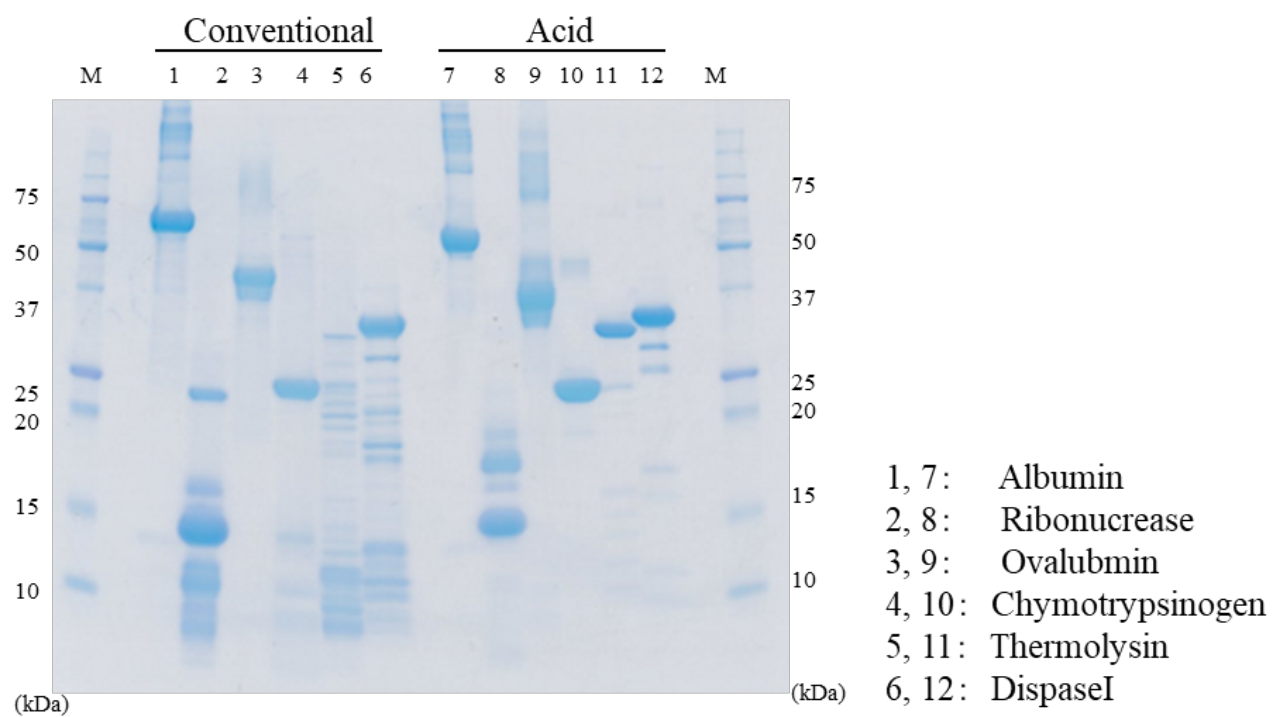


Fig. 11. Application of acid treatment SDS-PAGE method to other proteins.

Table 4. Comparison of molecular weight of various protein used in this study.

Protain	MW (kDa)
Bovine serum albumin	66.6
Ribonucrease	13.7
Ovalbumin	42.7
Thermlysin	34.3
Dprotease	32.3

4-3 プロテアーゼが混入したサンプルの酸処理 SDS-PAGE 法による分析

4-3-1 序

プロテアーゼが混入したサンプルのタンパク質の分析に、酸処理 SDS-PAGE 法が応用可能か否かを検証した。アルブミンと D プロテアーゼを混在させ、擬似的にプロテアーゼ混入サンプルを作成し、酸処理 SDS-PAGE 法と従来の SDS-PAGE 法でバンドパターンの比較測定を試みた。

4-3-2 材料および方法

牛血清アルブミン (Wako)、ディスパーゼ I (Wako) を 2 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この牛血清アルブミンとディスパーゼ I が混合された混合サンプル 50 μ L に 0.05 M 硫酸を 50 μ L 添加し、サンプル前処理液 100 μ L を添加した後に、30°C で 0~30 min 静置し、煮沸処理無しに 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15% [w/v] ゲル) に供した (酸処理 SDS-PAGE 法)。上述の混合サンプル 100 μ L に、サンプル前処理液 100 μ L を添加した後に 30°C で 0~30 min 静置し、煮沸処理し 10 μ L ずつ、SDS-PAGE (15% [w/v] ゲル) に供した (従来の SDS-PAGE 法)。

4-3-3 結果および考察

従来の SDS-PAGE 法ではサンプル処理後に 30℃で静置すると時間の経過と共にアルブミンバンドは薄くなり 30 min 経過後には消失した (Fig. 12)。D プロテアーゼのバンドも同様に時間の経過と共に薄くなり、相対的に不純物バンドが増加した。従来の SDS-PAGE で用いるサンプルの処理法では、プロテアーゼによる自己消化および目的タンパクの分解が起こることが示された。これまで従来の SDS-PAGE 法ではサンプル処理液の添加から煮沸までの時間が規定されておらず、プロテアーゼ混入サンプルの場合は、経時的に分解が起こることが推察された。

一方、酸処理 SDS-PAGE 法では、サンプル処理後 30℃で 30 min 静置後もそのバンドパターンは全く変わらなかった。酸処理により D プロテアーゼが失活しており、アルブミンの分解が起こらないことが示された。これらのことから酸処理 SDS-PAGE 法は、アルブミンと D プロテアーゼが混在しているようなプロテアーゼ混入サンプルにも適用できることが示された。

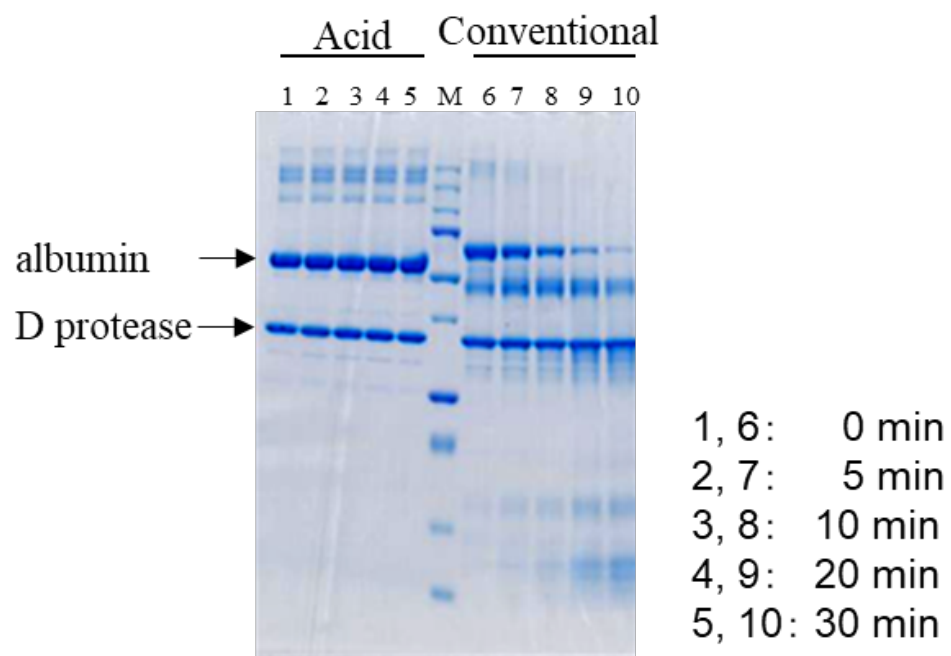


Fig. 12. Application of acid treatment SDS-PAGE method to albumin and D protease.

4-4 キャピラリー電気泳動への応用

4-4-1 序

前節までに、酸処理 SDS-PAGE 法は、一般的なプロテアーゼ、一般的なタンパク、プロテアーゼとタンパクが混在したサンプルのタンパク質の純度測定に有効であることが示された。キャピラリー電気泳動は、SDS-PAGE 法と異なり、ゲルを作製する必要がなく、用いるサンプルが少量で、短時間の電気泳動が可能であり、その純度も自動的にソフトにより解析されるため、純度の分析法としてハイスループットな処理が可能となる。そこで、SDS-PAGE 法と同様にタンパク質の純度分析に用いられているキャピラリー電気泳動について、酸処理 SDS-PAGE 法を応用し、前処理時に酸を添加し煮沸しない、という方法が有効であるかを検証した。Biorad 社製 EXPERION キャピラリー電気泳動装置を用い、ディスパーゼ I および精製酵素のタンパク質の純度分析を試みた。

4-4-2 材料および方法

キャピラリー電気泳道装置における分析

ディスパーゼ I および精製酵素を 1 mg あるいは 2 mg/mL になるように 50 mM トリス-2 mM 酢酸カルシウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。タンパク質分析量キャピラリー電気泳動のサンプル処理として Biorad 社の標準プロトコル (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bullettin_10004490.pdf) である以下の A の方法から B (煮沸しないもの)、C (酸を添加し煮沸しないもの) を調製し、キャピラリー電気泳動装置での分析に使用した。

A: 1 mg/mL に溶解した上記酵素サンプル 4 μ L にバイオラッド社製サンプル処

理液 2 μL を添加し、煮沸してキャピラリー電気泳動に供した。

B : 1 mg/mL に溶解した上記酵素サンプル 4 にバイオラッド社製サンプル処理液 2 μL を添加し、煮沸せずにキャピラリー電気泳動に供した。

C : 2 mg/mL に溶解した上記酵素サンプル 50 μL に 0.05 M 硫酸を 50 μL 添加し、よく攪拌をした。この混合液 4 μL にバイオラッド社製サンプル処理液 2 μL を添加し、煮沸せずに Biorad 社製 EXPERION キャピラリー電気泳動装置に供した。本装置はキャピラリー電気泳動からデンストメーター解析までを自動的に装置内で行う。

4-4-3 結果および考察

サンプル前処理法として、A: Biorad 社の標準プロトコル及び、B: Biorad 社の標準プロトコルで前処理し煮沸をしなかったもの、ではいずれもメインバンドが分解され低分子側に不純物バンドが多数認められた (**Fig. 13**)。一方、C: 酸処理後に Biorad 社のサンプル処理液を添加し、煮沸せずにキャピラリー電気泳動に供したものは、メインバンドがしっかりと確認され、ディスパーゼ I と精製酵素で純度の差が反映された (**Fig. 13**)。Biorad 社製キャピラリー電気泳動装置のサンプル処理液やキャピラリー内の溶液組成などは明らかにされていないが、一般的にタンパク測定用のキャピラリー電気泳動装置では、SDS-PAGE と同様にポリアクリルアミドを用いたキャピラリー内溶液が用いられ、サンプル処理液により SDS 化されたタンパクをポリアクリルアミド中に電気泳動することにより分子篩効果でタンパクを分析する。キャピラリー電気泳動においても、サンプル処理前に酸を添加し、瞬時に D プロテアーゼを失活させることにより、酸処理 SDS-PAGE と同様に純度の分析が可能であることが示された。

キャピラリー電気泳動の結果を Biorad 社の純度解析ソフト (Experion Software、http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_3171.pdf) に供すると、ディスパーゼ I の純度は 82%、精製酵素の純度は 98%であると示され、酸処理 SDS-PAGE 法と同等の純度を示すことが明らかとなった。これらの事から、酸処理法は、キャピラリー電気泳動にも応用することが可能であり、ディスパーゼ I および精製酵素の純度を正確に分析できることが示された。

また、SDS-PAGE 法では精製酵素のような 2%以下の不純物を分析する際に、少量の不純物バンドを検出するためには高濃度で分析する必要があるが、メインバンドが濃くなりすぎてデンスitomーターのレンジを外れるため、1 レーンで純度を分析することが難しくなる。このために第 3 章 6 節で述べたように、様々

な適切な濃度に適宜、調製した複数のサンプルの分析により純度測定を行う必要がある（段階希釈法）。一方、キャピラリー電気泳動法では、測定レンジが広く、デンストメーターの解像度が高いために 1 サンプル（1 濃度）での純度分析が可能となることが示された。さらにゲルを作製する必要がなく、用いるサンプルが少量で、短時間の電気泳動が可能であるため、ハイスループットな純度の分析が可能となることが示された。

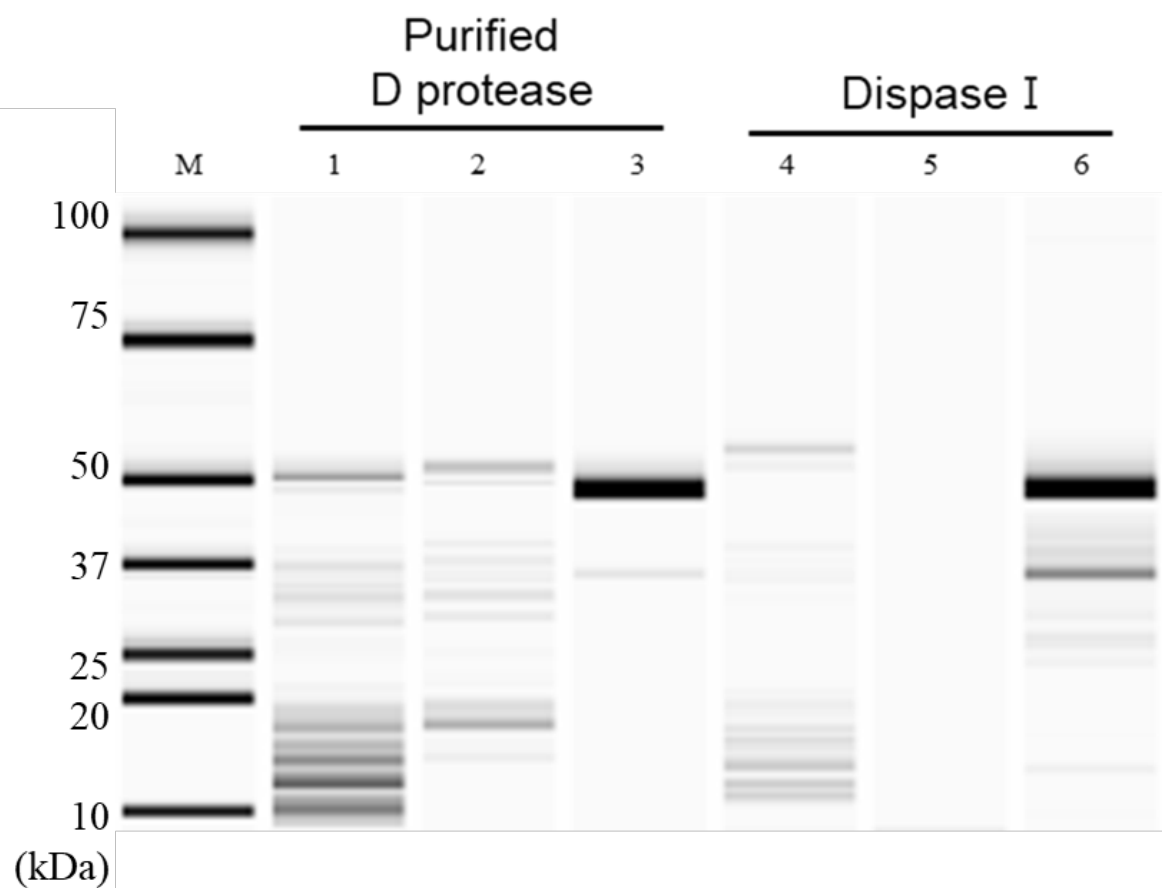


Fig. 13. Purity analysis of Dispase I and purified Dispase I by Capillary Electrophoresis using various pretreatment method. (lane1, 4: sample treated A. lane 2, 5: sample treated B. lane 3, 6: sample treated C)

第 5 章 総括

タンパク質の純度分析法として SDS-PAGE 法は一般的に用いられている。しかしながら、サンプルの前処理として煮沸処理が必要となる上、サンプル中にプロテアーゼを含んでいる場合に分解が起こり、分析結果に影響を及ぼすことがある。

私は、中性金属プロテアーゼ製剤であるディスパーゼのメインタンパクである 32 kDa の D プロテアーゼの含有量を SDS-PAGE 法を用いて分析すると、サンプル中にプロテアーゼを含んでいるため、プロテアーゼ自体の分解が起こり、従来の測定法（SDS-PAGE 法など）では正確な純度の測定ができないことを独自に見出した。この現状を踏まえ、本研究ではプロテアーゼ含有サンプルの純度を正確に分析する方法を開発することを目的とした。さらに、開発した方法の、一般的なプロテアーゼやプロテアーゼ混入サンプルへ適用性の拡大についても検討を試みた。

第 1 章では本研究の目的を述べた。

第 2 章では、近年、ディスパーゼ製剤が医薬用途での利用が検討されており、純度を正確に測定し、コントロールすることが求められるようになったことを解説したのち、その純度はこれまで明らかとなっていないことを考察し、本研究の背景と意義を述べた。

第 3 章では中性プロテアーゼの代表として、プロテアーゼ製剤であるディスパーゼ I を用い、従来の SDS-PAGE 法についてプロテアーゼを分析する際に分解が起こるメカニズムを明らかとするとともに、その分解を防ぎ正確に純度を測定するための研究を行った。ディスパーゼ I およびディスパーゼ I から精製した高度精製品を従来の SDS-PAGE 法で分析すると、いずれもメインバンドで

ある D プロテアーゼのバンド以外に、D プロテアーゼよりも低分子側に多数のバンドが認められた。そのバンドパターンが完全に一致することや、不純物バンドが低分子側にしか認められないことから、SDS-PAGE 前処理中に自己消化（あるいは熱分解）による D プロテアーゼの分解が生じていることが推察された。そこで、D プロテアーゼは至適 pH が 7.5 の中性プロテアーゼであることから、酸を添加し、またサンプル処理中の熱分解を考慮して煮沸せずにサンプルを処理し、SDS-PAGE をおこなった。この結果、プロテアーゼ活性は瞬時に、不可逆的に失活し、サンプル処理中の自己分解が抑制されることが示された。さらに、添加する酸の種類及び濃度について詳細に検討した結果、本研究で検討した酸では、いずれも pH2.5 以下であれば、サンプル処理中の自己分解は抑制された。酸の分解や揮発を考慮して、添加する酸は硫酸を選択し、濃度を 0.05 M とすることで、サンプル処理で酸性となったサンプルは、SDS-PAGE に供する際にはサンプルバッファーにより中性に戻ることが示され、SDS-PAGE 中のバンドの移動度に酸が影響しないことが示された。以上の様にサンプル中に 0.05 M の硫酸を添加し、煮沸無しに SDS-PAGE に供するという簡便な方法（酸処理 SDS-PAGE 法）で、プロテアーゼの自己分解の抑制に成功した。開発した酸処理 SDS-PAGE 法を用い、精製度の異なるディスパーゼ製剤の D プロテアーゼの純度を分析した結果、ディスパーゼ II は 80%、ディスパーゼ I は 92%、高度精製品は 98%以上であることが明らかとなった。また、高度精製品で 2%ほど認められる 30 kDa のバンドは酸処理 SDS-PAGE 法のアーティファクトではなく、分析前から混在している不純物であることが示され、酸処理 SDS-PAGE 法は、自己分解が完全に抑制されていることが示された。このように、従来の SDS-PAGE 法では全くその精製度を反映させることができなかったが、酸処理 SDS-PAGE 法により初めてディスパーゼ製剤中の D プロテアーゼの純度を正

確に分析することが可能となった。

第4章では、酸処理 SDS-PAGE 法は中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、酸性プロテアーゼを含む一般的なプロテアーゼにも使用できることを示した。さらに、動物細胞からの抽出や微生物の培養液からの精製において、目的タンパク以外にプロテアーゼが混入しているサンプルも多く、そのようなサンプルのタンパク質の純度分析にも酸処理 SDS-PAGE 法は応用できることが示された。また、キャピラリー電気泳動においても、酸処理 SDS-PAGE 法を応用し、サンプル処理前に硫酸を添加し煮沸せずにキャピラリー電気泳動を行うことで、正確に純度の分析を行うことが可能となることを示した。キャピラリー電気泳動は、SDS-PAGE 法と異なり、ゲルを作製する必要がなく、用いるサンプルが少量で、短時間の電気泳動が可能であり、その純度も自動的にソフトにより解析されるため、純度の分析法としてハイスループットな処理が可能となる。

本研究で開発した酸処理 SDS-PAGE 法はサンプル中に酸を添加するという簡便な方法でプロテアーゼを含有する様々なサンプルの純度分析に使用でき、キャピラリー電気泳動にも応用でき、培養液中の網羅的なタンパク分析やタンパク精製における目的タンパクの純度分析等、多くの分野で応用できる可能性が期待される。

引用文献

Carol, A., Fergus, G., and David, C. (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**: 253-260.

Kaplan, H. J. and Tezel, T. H. (1996) Method for producing a posterior vitreous detachment, United States Patent. Patent No 5722428.

Kitano, Y. and Okada, N. (1983) Separation of the epidermal sheet by Dispase[®]. *Br. J. Dermatol.*, **108**: 555–560.

Koyama, Y., Kobayashi, M., Ohashi, K., Nagao, S., Niwa, J., Takahashi, H., Hoshino, T., and Marunouchi, T. (1990) Isolation and culture of panning method-enriched Langerhans cells from Dispase[®]-dissociated epidermal cells of the mouse. *J. Dermatol.*, **17**: 211–217.

Laemmli, U. K. (1995) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685.

Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**: 1145–1152.

Ruf, A., Stihle, M., Benz, J., Schmidt, M., and Sobek, H. (2013) Structure of

gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**: 24–31.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**: 1145–1152.

Wan, R., Hong, T., Tariq, Y., Chang, A. (2018) Pharmacotherapy of vitreomacular traction. *Curr. Pharm.*, **41**: 4874-4881.

Yabuta, Y., Takagi H. and Inouye M. (2002) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone dissecting conformational changes coincident with autoprocessing and the role of Ca^{2+} in subtilisin maturation. *J. Biochem.*, **131**: 31-37.

Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R. S., Shi, S., and Huang, G. T. (2009) iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.*, **19**: 469–480.

Yoshiki, M., Naoko, M., Kuniyo, I., and Motoki, K. (2012) Further stabilization of leu155 mutant thermolysins by mutation of an autodegradation site. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **166**: 735–743.

Yoshiki, M., Kouji, N., Hisae, A., Kuniyo, I., Motoki, K. (2004) Analysis of autodegradation sites of thermolysin and enhancement of its thermostability by

modifying leu155 at an autodegradation site. *J. Biochem.*, **135**: 547-553.

日本薬局方 第 14 版 一般試験法 タンパク消化力分析法

謝辞

本研究並びに論文作成は、筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 青柳 秀紀 教授のご指導の元に行われたものであり、その間、多大なるご助言とご教示を承りました。ここに謹んでお礼申し上げます。

本研究の論文作成にあたり、同大学院同研究科 生物機能科学専攻 市川 創作 教授、同 生命産業科学専攻 中島 敏明 教授、同 生物機能科学専攻 吉田 滋樹 准教授の適切なご助言とご教示を受け賜りました。厚く御礼申し上げます。

本研究における諸実験の遂行および博士号の取得にあたりましては、合同酒精株式会社 倉嶋克己取締役、同 酵素医薬品事業部 塩田一磨 副部長、同 酵素医薬品研究所 堀口博文 副所長、吉川潤グループマネージャーのご理解とご協力を賜りましたこと、深く感謝いたします。

本研究は、合同酒精（株） 酵素医薬品研究所 塩田一磨氏、吉川潤氏、小川俊氏、野口紀子氏ら多くのメンバーと共に行いました。多大なご協力に感謝するとともに、素晴らしい仲間と有意義な研究期間を過ごせたことを幸せに思います。

最後に、これまであらゆる面で著者を支えてくださった友人一同、並びに家族に心より感謝いたします。

付記

本論文は、下記の誌上ならびに学会発表した内容を基にしている。

[学術論文]

Tomohiro Fujita, Kazuma Shiota, Jun Yoshikawa, Shun Ogawa, and Hideki Aoyagi. (2019) Simple method for analyzing the purity of protease-containing samples by acid-treatment SDS-PAGE. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019 Jun 10. pii: S1389-1723 (18) 30960-5. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.04.014. [Epub ahead of print]

[特許]

特許第 5425930 号:電気泳動分析方法

国際公開 WO2011/062174 : ELECTROPHORETIC ANALYSIS METHOD

[学会発表]

藤田 智大, 小川 俊, 吉川 潤, 塩田 一磨. 酸処理を用いた SDS-PAGE によるプロテアーゼ含有試料の簡便な純度分析方法. 2014 年度 日本農芸化学会 東京大会

以下に要旨を記載する

【目的】 タンパク質の純度分析法として SDS-PAGE は一般的に用いられている。しかしながら、試料の前処理として煮沸処理の手間が必要となる上、試料中にプロテアーゼを含んでいる場合には前処理中に自己分解が起こり、分析結

果に影響を及ぼすことがある。合同酒精(株)が製造しているプロテアーゼ製剤であるディスパーゼ®に関して、再生医療領域を含む様々な分野で利用されているが、一般的な煮沸処理による SDS-PAGE では正確な純度分析が困難であった。医療分野での利用を考慮すると、正確に純度を分析する方法が必要であるため、SDS-PAGE の前処理法を検討し、プロテアーゼ製剤の正確で簡便な純度分析方法を開発した。

【方法】ディスパーゼ® I 溶液 50 μ l に 0.05 M 硫酸 50 μ l を混和し、サンプル処理液（25% グリセリン、5.0% SDS、ブロムフェノールブルーを含む）を 100 μ l 加え良く混和した後に、10 μ l を SDS-PAGE（15%ゲル）に供した。従来法 SDS-PAGE として、ディスパーゼ I 溶液に等量のサンプル処理液を加え良く混和し、3 分間煮沸した後に、10 μ l を SDS - PAGE に供した。

【結果】ディスパーゼ® I 及び高度精製品を従来法 SDS-PAGE に供すると、いずれにおいても、ディスパーゼタンパクのメインバンド以外に自己分解に因ると思われる低分子側のバンドが無数に認められた。ディスパーゼタンパクは中性金属プロテアーゼであることから、試料溶液に硫酸を添加し酸性下（pH 0.7～1.9）で即座に失活させることを試み、サンプル処理液を添加後、煮沸をせずに SDS-PAGE に供した結果、不純物バンドが殆ど認められなくなった。強酸性下にすることで自己分解が抑制され、変性したタンパク質は煮沸処理なしに SDS 化されることが示された。本法を用いディスパーゼ®製剤の純度を分析した結果、ディスパーゼ® I は 92%以上、高度精製品は 98%以上であることが明らかとなった。また本法は、他のプロテアーゼを含むタンパク質試料を分析する際にも有効であることが示された。